

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12N15/66

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
-------------	--	-------------------------------

X	<p>SOBCZAK J ET AL: "Effect of histone H1, poly(ethyleneglycol) and DNA concentration on intermolecular and intramolecular ligation by T4 DNA ligase." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, (1988 AUG 1) 175 (2) 379-85., XP002115971 page 382 -page 383; figure 4</p>	<p>1,3-5,7, 8,11</p>
X	<p>NAGAKI S ET AL: "Non- histone chromosomal proteins HMGI and 2 enhance ligation reaction of DNA double-strand breaks." BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, (1998 MAY 8) 246 (1) 137-41., XP002115972 page 138 -page 140; figures 2-5</p>	<p>1,3-5,7, 11</p>

-/-

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

17 avril 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

08/05/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Espen, J

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GRASSER KD ET AL: "The maize chromosomal HMGa protein recognizes structural features of DNA and increases DNA flexibility" PLANT JOURNAL., vol. 6, no. 3, 1994, pages 351-358, XP002135885 BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD., GB ISSN: 0960-7412 page 357	1
X	WO 98 46271 A (STRATAGENE INC) 22 octobre 1998 (1998-10-22) page 4 -page 5; figure 3	11-13
P,X	EP 0 919 623 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH) 2 juin 1999 (1999-06-02) figures 2-4; tableau 1	11,14
A	AMOUYAL M: "THE REMOTE CONTROL OF TRANSCRIPTION DNA LOOPING AND DNA COMPACTION" BIOCHIMIE (PARIS) 1991, vol. 73, no. 10, 1991, pages 1261-1268, XP000893196 ISSN: 0300-9084	
A	WANK HERBERT ET AL: "Antibiotic-induced oligomerisation of group I intron RNA." JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY 1996, vol. 258, no. 1, 1996, pages 53-61, XP000893194 ISSN: 0022-2836	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/00004

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9846271 A	22-10-1998	AUCUN	
EP 0919623 A	02-06-1999	EP 0916733 A	19-05-1999
		JP 11221089 A	17-08-1999

CONSTRUCTION D'ACIDES NUCLEIQUES RECOMBINANTS CIRCULARISES AU MOYEN D'GENTS COMPACTANT L'ADN

La présente invention est relative à la construction d'acides nucléiques recombinants circularisés, du type constitués d'un vecteur et d'un insert pouvant être d'une taille supérieure à quelque kilobases.

L'invention concerne aussi le procédé de préparation de telles constructions et les kits pour leur mise en œuvre, ainsi que les acides nucléiques recombinants susceptibles d'être obtenus par ce procédé.

La construction des vecteurs ADN destinés à être transférés dans les cellules procaryotes ou eucaryotes, vise toute utilisation *in vitro* et *in vivo* de ces séquences, comme l'analyse des effets biologiques de la séquence ADN (effet de l'ADN ou de son expression), expression d'ARN, expression de protéines, amplification de sondes d'hybridation pour le diagnostic médical, thérapie cellulaire ou thérapie génique, vaccination, etc....

La construction de vecteur recombinant, consistant à insérer un fragment d'ADN dans un vecteur, passe par une étape de refermeture du vecteur *in vitro*. Pour qu'il y ait refermeture, les extrémités du vecteur finalisé doivent être proches l'une de l'autre. Ces extrémités se déplacent au sein d'une sphère de rayon égal à la longueur du fragment et ayant pour centre l'une des extrémités. Ce volume est d'autant plus grand que la taille du vecteur finalisé est élevée. Par conséquent, la probabilité de rencontre des deux extrémités décroît avec la longueur du vecteur finalisé.

Quant à l'insertion du fragment dans le vecteur, elle se fera si la probabilité de rencontre entre les extrémités de l'insert et celles du vecteur d'origine est élevée. L'insertion dépend donc de la concentration en extrémités.

En d'autres termes, la proportion de produits insérés et cyclisés dépend de la longueur du vecteur finalisé pour le processus intramoléculaire de refermeture, et de la concentration totale en extrémités libres, pour ce qui concerne le processus intermoléculaire de ligation.

Les vecteurs de toute première génération sont des vecteurs d'origine bactérienne, dérivés de plasmides. D'autres vecteurs tiennent compte plus précisément des spécificités des gènes eucaryotes, en particulier de leur taille. C'est le cas des cosmides, composés hybrides de phage λ et de plasmides se répliquant dans E. Coli, et des YAC dont l'organisme hôte est la levure.

Les cosmides permettent l'insertion jusqu'à 45 kb, les YAC jusqu'à 1000kb. Ces vecteurs sont destinés à l'analyse des banques d'ADN génomique ou à l'analyse chromosomique. Leur efficacité est liée à l'éventail de fragments différents qu'ils peuvent accueillir. Ils seraient d'un emploi lourd s'il s'agissait de n'y insérer qu'un fragment précis et de l'amplifier. Ainsi, pour préserver leur stabilité, le vecteur d'insertion doit conserver une taille minimale (33kb pour les cosmides, 150kb pour les YAC). Or, la manipulation de telles longueurs d'ADN comporte de nombreuses difficultés (cassures, cisaillement, etc...), alors que la séquence considérée est fréquemment de taille inférieure, n'atteignant que quelques kb lorsque l'ADN complémentaire est préféré à l'ADN génomique. En outre, la répllication

dans E. Coli de vecteurs de taille importante tels que les cosmides, ainsi que la stabilité des YAC dans la levure, sont limitées, ce qui conduit à des remaniements de séquence. Pour les cosmides, l'efficacité de l'empaquetage de l'ADN et de l'infection par le phage λ compense cet inconvénient dans une certaine mesure.

Une autre technique d'insertion consiste à utiliser des adjuvants de nature chimique, tel le polyéthylène glycol (Zimmerman S.B. and Pfeiffer B. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5852 (1983), ou encore le chlorure d'Hexamine cobalt (Maniatis et al., molecular cloning / a laboratory manual, second edition, 1989) pour les ligations à bouts francs. Ces ligations sont moins aisées que leurs homologues à bouts cohésifs, et exigent des concentrations en ADN et ligase plus élevées. Ces adjuvants chimiques ont pour but de favoriser l'aggrégation entre insert et vecteur (réaction intermoléculaire), et de diminuer les concentrations en ADN et ligase, et ils ne s'adressent pas à la construction de vecteurs de grande taille.

A ce jour, il n'existe pas de technique permettant de faciliter la circularisation et la préparation de vecteurs valable aussi bien pour les tailles modérées, quelques milliers de paires de bases, que pour des tailles plus importantes, au dessus de 10 kb.

Par vecteur de grande taille, il faut entendre un vecteur d'au moins 10 kb, dans lequel est intégré un insert de plusieurs kilobases.

Cosmides et YAC répondent à des besoins d'analyse et recherchent un éventail d'insertion aussi large que possible des banques d'ADN. Les adjuvants à la ligation, actuellement employés, ne sont jamais des

protéines naturellement conçues pour condenser l'ADN et il ne s'agit pas de favoriser l'insertion de fragments de grande taille et la refermeture du recombinant.

5

La présente invention a pour but de faciliter la circularisation et la préparation de vecteurs plus particulièrement de grande taille.

10

Dans la méthode selon la présente invention, c'est la présence de protéine de compaction lors de la ligation qui augmente le taux de produits de ligation et la probabilité d'amplifier le produit correct.

15

En effet, un des intérêt de l'invention réside dans le domaine du clonage qui comporte généralement une étape préalable de cyclisation du recombinant *in vitro*. L'efficacité de la cyclisation dépend de la taille du recombinant, et est améliorée par la compaction de l'ADN. En effet, la construction de vecteur passe par une étape de fermeture de ce vecteur *in vitro*. L'efficacité de cette fermeture dépend de la taille du fragment d'ADN.

25

En conséquence, la présente invention a pour objet un procédé de préparation d'acides nucléiques recombinants circularisés, du type constitués d'un vecteur et d'un insert caractérisé en ce que :

a) on réalise la ligation de l'insert et du vecteur en présence d'un agent de compaction de l'ADN, et

30

b) on sélectionne par tout moyen approprié les acides nucléiques recombinants constitués du vecteur et de l'insert.

Ainsi, une application du procédé de l'invention est le clonage d'un insert dans un vecteur dans les conditions définies ci-dessus, permettant

avantageusement d'obtenir un vecteur recombinant de grande taille.

Le procédé de l'invention est tout particulièrement adapté à la préparation d'acides nucléiques recombinants circularisés de taille modérée ou de grande taille. C'est à dire d'une taille supérieure à quelques kb, de préférence supérieure à 5 kb et tout préférenciellement supérieure à 8 ou 10 kb.

Lors de l'étape (b), il faut entendre par moyen approprié de sélection, le transfert des produits de la ligation dans un milieu cellulaire approprié au clonage de l'ADN, par exemple *e.Coli* ou la levure, en présence d'un antibiotique, comme l'ampicilline ou la tetracycline, si le vecteur porte un gène de résistance à un antibiotique, et un test pour la présence de l'insert, par exemple, dans le cas du gène-témoin *lacZ*, l'hydrolyse du composé X-gal par la β -galactosidase produite.

Mais tout autre moyen de sélection, en particulier ceux adaptés à la production d'ADN aux normes pharmaceutiques pour la thérapie génique ou cellulaire, peut être utilisé. De même, l'étape ne comporte pas nécessairement de test spécifique pour la présence de l'insert, l'insertion pouvant être vérifiée par séquençage de l'ADN après obtention des vecteurs par le procédé de l'invention.

Les histones sont les protéines les plus abondantes du noyau ; elles sont de petite taille (11 à 25 kDa) et possèdent un caractère très basique ($pH > 10$). Il existe cinq types d'Histones appelés respectivement H1, H2A, H2B, H3 et H4, et ces cinq types se retrouvent avec des variantes chez tous les eucaryotes (excepté H1 qui ne semble pas exister chez la levure, et qui est remplacé par

l'histone H5 dans certains organismes). In vivo, H2a, H2b, H3 et H4 s'assemble sous forme d'octamère. L'ADN s'enroule deux fois autour du cœur octamérique pour former une structure nucléosomique. L'histone H1 ne fait pas partie de ce noyau, mais sert à verrouiller l'ADN autour de l'octamère. Dans la cellule eucaryote, la compaction de l'ADN par les histones aurait notamment pour effet de rapprocher deux sites de régulation transcriptionnelle éloignés sur le chromosome, et de permettre la formation d'une boucle de chromatine par interaction directe entre ces sites. L'expression d'un gène peut ainsi être commandée à distance de ces gènes (Amouyal, Biochimie (1991), 73, p.1261-1268).

Selon l'invention, la ligation de l'insert et du vecteur d'origine est effectuée en présence de produits compactant l'ADN. Le vecteur d'insertion contient une origine de réplication et avantageusement un gène de sélection, pour la croissance et la sélection dans le type cellulaire considéré.

Les agents de compaction de l'ADN sont des protéines, des mélanges de protéines, ou des dérivés des protéines. Par le terme protéines, il faut entendre protéines naturelles et synthétiques.

Les produits compactant l'ADN sont des protéines ou tout agent présentant les mêmes propriétés, et plus particulièrement des protéines histones ou protéines apparentées. Outre les histones, l'agent de compaction de l'ADN peut être choisi parmi toutes les protéines connues pour compacter l'ADN, notamment les protéines d'enveloppe virales ou de phages, les protéines du chromoïde bactérien (HU, H-NS, etc...), les protéines chromosomales non histone, les HMG, etc..., tout mélange de ces composés, ou tout dérivés de ceux-ci.

Par conséquent, pour l'étape (a) du procédé selon l'invention, l'agent de compaction de l'ADN est choisi parmi les histones, les protéines d'enveloppe virales ou de phages, les protéines du chromoïde bactérien (HU, H-NS, etc...), les protéines chromosomales non histone, les HMG, tout mélange de ces composés, ou tous dérivés de ceux-ci.

ou un mélange desdits agents de condensation.

De manière préférentielle, l'agent de compaction de l'ADN est un mélange d'histones.

L'Inventeur a démontré qu'un mélange d'histones ou une histone isolément conduisaient à des résultats analogues. L'histone H1, de structure différente, et n'étant pas une histone formant l'octamère, mais plutôt une histone de verrouillage, utilisé isolément ne semble pas apporter d'aussi bons résultats que les autres histones.

Ceci s'explique car H1, du fait de sa structure différente, ne se fixe pas sur l'ADN linéaire, mais se fixe de préférence sur de l'ADN superenroulé (Van Holde et al., Biophysical journal, 1997, 72, p.1388-1395).

Dans un mode préférentiel de réalisation de l'invention, les agents de compaction sont ajouté au milieu de ligation. Ce milieu comprend l'ADN en solution dans le tampon de ligation. La ligation est assurée par addition d'une enzyme de ligation au milieu de ligation.

De manière préférée, mais non limitative, la ligase utilisée est la *E.Coli* T4 DNA Ligase.

Une caractéristique de l'invention réside dans la concentration (C) d'agents de compaction présents dans le milieu de ligation.

5 Cette concentration (C) en agent de compaction est déterminée de façon à ne pas entraîner une rigidification de l'ADN. Si cela se produisait, l'ADN ne pourrait se courber, il ne pourrait y avoir contact entre les extrémités du vecteur finalisé, et la ligation serait empêchée.

10 Pour une protéine ou un mélange de protéines donné, la quantité d'agent de compaction est définie par calcul et testé par gel de retardement, de manière à ne pas saturer un fragment d'ADN-témoin en protéines.

Cette concentration (C) peut être exprimée en mg de protéines par nanogramme d'ADN total contenu dans le mélange de ligation et par paire de base de recombinant. Elle dépend de la longueur d'ADN à liguer, et l'Inventeur a défini plusieurs lois, correspondant à chacun des agents protéiques employés:

Ainsi pour le mélange naturel d'histones Sigma,

$$(C) = 1,5 \cdot 10^{-11} \text{ mg/ng ADN/pb}$$

pour l'histone H2b Sigma,

$$(C) = 1,5 \cdot 10^{-12} \text{ mg/ng ADN/pb}$$

25 Par extrapolation, l'Inventeur a défini la loi suivante qui peut s'appliquer à toutes les protéines compactantes utilisées :

$$(C) = 10^{-x} \text{ mg/ng ADN/pb}$$

dans laquelle x est compris entre 8 et 15.

30 La valeur x est fonction de la nature de l'agent de compaction utilisé.

Pratiquement, l'efficacité du clonage est toujours améliorée si la concentration se trouve dans un

intervalle encadrant la valeur ainsi définie de 20 à 1000 %, et de manière préférée entre 33 à 200 %.

5 Le procédé selon la présente invention se caractérise donc en ce que la concentration (C) en agent de compaction est déterminée par la loi suivante :

$$(C) = (10^{-x} \text{ mg/ng ADN/pb}) \times Y$$

dans laquelle :

10 x est compris entre 8 et 15, et de préférence entre 10 et 12, et
Y varie entre 0,2 et 10, de préférence entre 0,33 et 2.

5 La présente invention est aussi relative à un kit pour la mise en œuvre de la méthode de préparation d'acides nucléiques recombinants de grande taille circularisé telle que définie auparavant. Ce kit comprend les réactifs suivants :

- un tampon de ligation,
 - une ligase,
 - un agent de compaction défini précédemment.
- 20 Comme agent préférentiel de compaction, il sera utilisé soit un mélange d'histones, une histone isolée.

25 Une autre caractéristique de l'invention concerne les paramètres de mise en œuvre de la méthode et du kit objet de l'invention. La ligation est conduite dans les conditions usuelles, avec les modifications suivantes.

30 Les conditions usuelles dépendent de la ligase employée et des indications fournies par la société commercialisant l'enzyme. Pour la T4 DNA ligase commercialisée par NEB Biolabs, la ligase est employée avec un tampon :

- 5mM Tris-HCl
- 1mM MgCl2

- 1mM DTT
- 0,1 mM ATP
- 2,5µg/ml BSA

5 Préalablement à la ligation, l'agent protéique
est mis en solution dans le tampon de ligation contenant ou
non du glycerol (ou dilué dans le milieu de ligation, s'il
est fourni sous forme de solution). Il est incorporé dans
le milieu de ligation dans les proportions définies par la
10 loi indiquée auparavant.

De façon préférentielle, le kit comprend un
agent stabilisant incorporé au milieu de ligation en même
temps que la protéine, et destiné à empêcher la
5 dénaturation, l'agrégation et/ou l'adsorption de la
protéine sur les parois du tube réactionnel à ces fortes
dilutions. Un kit selon l'invention comprend donc :

- un tampon de ligation,
 - une ligase,
 - un agent de compaction,
 - éventuellement un agent stabilisant pour la
- protéine.

De manière privilégiée, ce tampon de dilution
est le glycérol ou tout composé présentant les mêmes
25 caractéristiques.

Un kit préféré selon la présente invention
comprend :

- la ligase est la E.Coli T4 ligase,
 - le tampon de ligation correspondant,
 - une ou plusieurs histones comme agent de
- 30 compaction,
- l'agent stabilisant, s'il est présent, est du
glycérol.

L'invention concerne aussi les recombinants, de préférence grande taille, susceptibles d'être obtenus par le procédé décrit ci-dessus.

5 Un tel recombinant peut être constitué par un vecteur contenant une origine de répllication, éventuellement un gène de sélection, l'insert éventuellement associé à un gène indicateur permettant de révéler la présence de l'insert comme le gène de la β -galactosidase ou un gène de sélection.

10 L'invention trouve des applications bien entendu en matière de clonage, mais aussi dans le domaine de la thérapie génique et notamment en matière de vaccination génique. Ainsi, l'invention concerne plus particulièrement un acide nucléique recombinant circularisé
5 de grande taille supérieure à quelques kilobases constitué d'un vecteur et d'un insert. Dans une première forme de réalisation de l'invention destinée à la thérapie génique, ledit insert comprend un ou plusieurs ADNc codant pour une
10 ou plusieurs protéines nécessaires à la correction d'une déficience génétique, placé(s) sous le contrôle des séquences permettant leur expression in vivo.

Dans une seconde forme de réalisation de l'invention destinée à la vaccination génique, ledit insert
25 comprend un ou plusieurs ADN codant pour un ou plusieurs antigènes, placé(s) sous le contrôle des séquences permettant leur expression in vivo. Plus particulièrement, ledit insert comprend une ou plusieurs et de préférence la totalité des séquences d'ADN codant pour les antigènes
30 susceptibles d'induire une réaction immunitaire.

Selon une forme de réalisation préférée, le vecteur est un vecteur non viral, tout en pouvant contenir des éléments viraux.

WO 00/40735

12

PCT/FR00/00004

D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture des exemples suivants, donnés à titre non limitatif, et concernant la construction d'un recombinant de grande taille au moyen de protéines compactant l'ADN, et de son clonage dans *E.Coli* et qui font référence aux dessins en annexe dans lesquels :

La figure 1 représente la complexation de la protéine au fragment fR4 dans les conditions de ligation, suivie par retardement de la migration électrophorétique du fragment en gel d'agarose 0,4%.

- 1a : Essai 1
- 1b : Essai 4
- 1c : Essai 1 avec protéine purifiée H1

(exemple 2)

La figure 2 représente la digestion par *EcoRI* des trois recombinants R4-LZ avec insert obtenus dans l'essai 11.

La figure 3 représente la digestion par *EcoRI* de 6 des 20 recombinants K-LZ (exemple 1b).

La figure 4 représente l'augmentation de la quantité de produits de ligation en présence d'histones, gel d'agarose 0,4 %.

La figure 5 représente le test de sensibilité aux nucléases éventuellement présentes dans la préparation d'histones

EXEMPLE 1 : LIGATION EN PRESENCE D'UN MELANGE D'HISTONES, SELECTION ET AMPLIFICATION DES PRODUITS DE LIGATION PAR E.COLI.

Deux recombinants de taille différente ont été construits. Le premier (recombinant R4-LZ) a une taille de 12034 paires de bases, et le second, plus petit, (recombinant K-LZ) a une taille de 6785pb

WO 00/40735

13

PCT/FR00/00004

Exemple 1a : Clonage d'un recombinant de 12034 pb.

I - Matériel et Méthodes.

I.1. Fragments.

Ce premier recombinant R4-LZ d'une taille de 12034 paires de bases est issu de la ligation de deux fragments fR4 et fLZ.

- Fragment de 8159 paires de bases : fR4.

Ce fragment est issu du plasmide pREP4 (invitrogen) par digestion complète du plasmide de 10183pb par les enzymes de restriction SalI (positions 7 et 1091) et SpeI (site unique à 9250).

Les fragments obtenus par digestion ont des tailles respectives de 8159, 1084 et 940pb.

Le fragment de 8159pb contient l'origine de répllication colE1 et le gène de résistance à l'ampicilline d'E. coli. Il est séparé des autres fragments par migration électrophorétique sur gel d'agarose à bas point de fusion (Seaplaque LMP agarose FMC Bioproducts), excision et extraction de la bande correspondante.

- Fragment de 3875 paires de bases : fLZ

Ce fragment est issu d'un plasmide de 6206pb contenant le gène lacZ sous le contrôle d'un promoteur d'E. coli (construction dérivée du plasmide pUT79 de la société Cayla, Toulouse).

Par digestion aux sites uniques SpeI (position 29) et SalI (position 3904 suivie d'une séparation électrophorétique, le fragment de 3875pb contenant le gène lacZ sous contrôle du promoteur bactérien, est séparé du fragment de 2331pb.

I.2. Protéine compactante.

Il s'agit de la préparation de type IIA (référence H9250 Sigma) contenant toutes les histones de sérum de veau sans fractionnement.

5 Cette préparation commercialisée sous forme lyophilisée est mise en solution dans le tampon de ligation juste avant emploi, dans les concentrations indiquées ultérieurement.

I.3. Ligations.

10 Les deux fragments FR4 et FLZ sont mélangés dans les proportions indiquées ultérieurement dans 20 µl de tampon de ligation pour la T4 DNA ligase d'E. coli. Ces conditions de ligation sont voisines de celles classiquement employées (voir Current Protocols et

5 Maniatis). Lorsque c'est nécessaire, la protéine est ajoutée au mélange des fragments, à la concentration souhaitée. La T4 DNA ligase est ajoutée après incubation dans un laps de temps compris entre 0 à 20 minutes, et plus particulièrement entre 3 et 5 minutes.

I.4. Transformation cellulaire par le milieu de ligation.

25 La souche DH5a est une souche déficiente en protéine RecA1, ce qui ne favorise pas les recombinaisons et réarrangements de l'ADN au sein de la cellule (notamment, les plasmides restent sous forme monomère tandis que les délétions sont évitées, page 4-13 Maniatis).

30 La souche est transformée par 10µl du mélange de ligation selon une variante de la méthode d'Hanahan (J. Mol. Biol. 166, 557, 1983) conduisant à une efficacité de 10^7 colonies/µg d'ADN. La sélection des cellules contenant le recombinant se fait sur milieu LB avec une concentration

de 200µg/ml d'ampicilline, et des boîtes de Pétri recouvertes de 200µl d'X-gal en solution dans le DMF.

1.5. Concentration en histones.

Une première valeur de la concentration en histones a été déterminée en calculant la quantité du mélange naturel d'histones supposée nécessaire à la formation d'un nucléosome toutes les 200 paires de base, et en choisissant délibérément de ne prendre qu'une partie de la quantité de protéine ainsi déterminée (le quart dans cet exemple) pour éviter la saturation du fragment en protéine. La loi qui en dérive est la suivante :

$(C) = 1.2 \cdot 10^{-11}$ mg de mélange d'histones / ng d'ADN/ pb du recombinant

Cette loi a été appliquée à la complexation du fragment le plus long, c'est-à-dire FR4 dans le cas présent. La complexation a été suivie par gel de retardement dans un gel à 0.4% d'agarose, en présence de la concentration déterminée et deux autres concentrations l'encadrant à 50% et 200% (Figure 1).

La loi réajustée à partir de ces gels et qui a été employée par la suite est très proche de la valeur calculée :

$(C) = 1.5 \cdot 10^{-11}$ mg du mélange d'histones /ng d'ADN / pb de recombinant

Chaque ligation a été effectuée en présence de 3 concentrations de protéine, la quantité dérivant de cette loi, et deux quantités l'encadrant à 50% et 200%.

Sur ces gels, on a :

- Voie 1 : Fragment FR4 sans protéines (excepté dans le gel correspondant à l'essai 4),

- Voie 2 : Fragment fR4 + 0,025 µg de protéine,
- Voie 3 : Fragment fR4 + 0,05 µg de protéine,
- Voie 4 : Fragment fR4 + 0,1 µg de protéine,
- Voie 5 : Fragment fR4 + 0,2 µg de protéine

5 (essai 4)

Pour 500 ng de fragment fR4, 0,025 µg, 0,05 µg et 0,1 µg du mélange d'histone remplissent les conditions.

Les ligations se déroulent aux trois concentrations correspondantes.

10

1.6. Vérification de l'absence de remaniements de séquence.

Les premiers tests pour l'obtention d'un recombinant dont la séquence n'a pas subi de réarrangements est la résistance à l'ampicilline conférée à la cellule et sa capacité à exprimer la b-galactosidase (colonies bleues en présence d'X-gal)

Une vérification supplémentaire est effectuée par digestion enzymatique. Ainsi, la coupure par EcoRI d'un recombinant R4-LZ correctement lié et refermé, doit résulter en 6 fragments de taille respective : 4172, 3076, 2875, 2021, 393 et 283pb.

25 Ces résultats sont illustrés par la figure 2, dans laquelle :

- Voie 1 : marqueur ϕ_{x174} /HaeIII
- Voie 2 : marqueur 1Kb
- Voie 3, 5, 7 : recombinants sans coupure
- Voie 4, 6, 8 : digestion de ces mêmes

30 recombinants par EcoRI

1.7. Autres tests préliminaires.

La transformation d'E. coli a été effectuée avec le mélange de ligation ne contenant qu'un seul des

deux fragments, en présence ou absence d'histones, pour confirmer la pureté électrophorétique des fragments et l'absence de refermeture au sein de la cellule. Un gel de retardement a été effectué sur le fragment fR4 avant chaque ligation avec ce fragment pour monitorer la complexation de l'ADN par la protéine. La séparation se fait sur gel d'agarose standard de 0.4%. Ce gel est effectué dans les mêmes conditions que les expériences de ligation, dans 20µl déposés sur gel et est repris dans la figure 4, dans laquelle :

- Voie 1 : mélange de ligation (recombinant R4-LZ) sans histones. (fragments fR4-8159pb- et fLZ-3875pb) fléchés)
- Voie 2 : mélange de ligation en présence de 0,025 µg d'histones
- Voie 3 : mélange de ligation en présence de 0,05 µg d'histones
- Voie 4 : recombinant R4-LZ purifié
- Voie 5 : marqueur 1Kb (Gibco BRL)
- Voie 6 : marqueur ϕ_{x174} RF/HaeIII (Gibco BRL)

II - Résultats.

Les 13 premiers essais ont été réalisés en se fondant sur la quantité de protéine déterminée par gel de retardement à partir de la complexation du seul fragment fR4, au lieu de la loi résultant de ces expériences. Or, la taille (8159pb) du fragment fR4, ne représente que les 2/3 de la taille totale du recombinant. En employant cette valeur pour les ligations, la loi n'est suivie qu'aux deux tiers (loi aux 2/3). Les essais les plus récents, qui sont

aussi les plus performants ont été réalisés en tenant compte de la quantité de protéine (1/3 de plus) qu'il fallait ajouter pour complexer l'ensemble du vecteur et de l'insert de la même manière que le seul fragment.

5 La présence d'inserts lacZ a été testée par la capacité de la colonie sélectionnée, à hydrolyser le composé X-gal (coloration bleue) et par l'obtention d'un profil correct de coupure enzymatique (test EcoRI) comme détaillé dans la légende de figure 2.

10

Le nombre de recombinants R4-LZ (12034pb) obtenus à partir des ligations en présence du mélange d'histones est donné ci-dessous :

Essai	1	2	3	4	4'	5	6
(- protéine)	0	0	0	0		0	0
(+ protéine)							
Nbre total	3,0,0	0,0,1	2,0,0	1,4,0,0	7,3,0,0	0,0,1	0,0,0
Avec insert lacZ	3,0,0	0,0,1	0,0,0	0,0,0,0	0,2,0,0	0,0,1	0,0,0

)

Essai	7	8	9	10	11	11'
(- protéine)	0	0	0	0	0	0
(+ protéine)						
Nbre total	0,0,0	0,0,0	0,1,0	3,5,3	0,3,2	1,1,0
Avec insert	0,0,0	0,0,0	0,1,0	1,1,0	0,3,2	0,0,0

25

Essai	12	12'	12''	12'''	13
(-protéine)	1(sans insert)				0
(+protéine)					
Nbre total	1,2,2	1,2,2	4,3,3	1,3,1	0,0,0
Avec insert	0,2,1	1,0,0	3,2,1	0,2,1	

30

Essai	14	15
(- protéine)	0	0

(+protéine)

Nbre total	11,8,2	0,1,0
Avec insert	9, 2,2	0,1,0

5

II.1. Essais 1-6, 9-13 : loi aux 2/3

- Essai 4 et 4' : 4 quantités de protéine ont été testée; 50, 100, 200, 400%

10

- Essai 7 : quantité de protéine 3 fois plus forte (150, 300, 600%)

- Essai 8 : quantité de protéine 10 fois plus forte (500, 1000, 2000%)

(pour compenser un éventuel défaut de complexation due à une concentration en ADN plus faible)

- Essais 14 et 15 : loi exacte

II.2. Effet du stockage et de la congélation de la protéine :

- Essai 2 : dilution de la protéine à partir d'une solution-stock de 100mg/ml dans le tampon de dilution contenant 50% de glycérol, conservée à -20°C, pour tester l'effet du stockage. Pour tous les autres essais, la solution de protéine a été fraîchement préparée à partir de la poudre lyophilisée.

25

II.3. Quantité d'ADN :

- Essais 1-5, 9-14 : fragment fR4 : 370ng

fragment fLZ : 190ng

30

(quantités équimoléculaires de vecteur et d'insert, 10µl de milieu de ligation)

- Essais 6, 7 et 15 : fragment fR4 150ng

fragment fLZ 75ng

WO 00/40735

20

PCT/FR00/00004

(quantités équimoléculaires 2.5 fois plus faibles, 10 μ l)

- Essai 8 : fragment fR4 : 150ng

fragment fLZ : 190ng

(3 fois plus de molécules fLZ que de molécules fR4, 10 μ l)

II.4. Ordre d'addition de certains composants dans le milieu de ligation :

- Essai 3 : le fragment fLZ a été ajouté en même temps que la ligase, après incubation de fR4 avec les histones comme dans les gels de retardement. Ce procédé a été évité par la suite car il favorise probablement la refermeture du vecteur sans insert.

II.5. Effet de la congélation du mélange de ligation :

- Essais 4 et 4' :

L'essai 4 a été réalisé avec 20 μ l de mélange de ligation. Après addition de la ligase, la moitié du mélange a été congelée à -20°C pour une transformation ultérieure (essai 4'). La congélation ne semble pas nuire à l'efficacité des histones.

II.6. Présence de glycérol dans le tampon de dilution :

- Essais 9, 10, 11', 12', 12''', 14, 15

Le glycérol est habituellement additionné au tampon de stockage, comme ci-dessus, pour empêcher la dénaturation et l'aggrégation des protéines lors des cycles successifs de congélation-décongélation. De même, le tampon de dilution de la protéine (tampon de ligation) a été additionné 0,1% de glycérol pour prévenir l'aggrégation ou

la dénaturation de la protéine dès sa mise en solution, ainsi que pour éviter de perdre la protéine sur les parois du tube dans les dilutions finales. Dans l'essai 11', le glycérol a été ajouté tardivement (après la première série de ligation de l'essai 11, c'est-à-dire après une dizaine de minutes).

II.7. Temps d'incubation avec les histones :

- Essais 11', 12', 12''' :

15 minutes au lieu de 5 minutes au maximum

On sélectionne toujours une part de recombinants ne possédant pas la séquence attendue par clonage dans E. Coli, même en l'absence d'adjuvants protéiques. Ces défauts sont engendrés au moment de la ligation *in vitro*, ou part répllication incorrecte de l'ADN par la cellule.

Dans cet exemple, la présence de recombinants incorrects est témoinnée par la présence de colonies blanches.

Dans le but de déterminer si la présence de ces recombinants incorrects est due spécifiquement à l'emploi d'une préparation protéique, notamment à la présence éventuelle de nucléases, et à la dégradation partielle de l'ADN qui pourrait en résulter un test de sensibilité de l'ADN aux nucléases dans la préparation d'histones employée a été effectué. Pour cela, le fragment fR4 ou le plasmide pR4 sont incubés avec les quantités de protéine indiquées voies 3 à 10. Les résultats sont illustrés par la figure 5, dans laquelle :

- Voie 3 : fragment fR4 (500 ng)
- Voie 4 : fragment fR4 + 0,025 µg d'histones
- Voie 5 : fragment fR4 + 0,05 µg d'histones
- Voie 6 : fragment fR4 + 0,1 µg d'histones
- Voie 7 : plasmide pR4 (500 ng)

- Voie 8 : plasmide pR4 + 5 µg d'histones
- Voie 9 : plasmide pR4 + 0,025 µg d'histones
- Voie 10 : plasmide pR4 + 0,05 µg d'histones
- Voie 11, 12, 13 : comme voies 8, 9, 10.

5 Incubation à 20°C pendant 1h30 au lieu de 20h.

- Voie 1 et 14 : marqueur 1Kb (Gibco BRL)
- Voie 2 et 15 : marqueur ϕ_{x174} RF/HaeIII (Gibco

BRL)

10 Aucune digestion nucléasique n'a été détectée dans ces conditions.

5 Les conditions expérimentales les plus performantes (celles qui permettent d'obtenir avec certitude, ne serait-ce qu'un seul recombinant, même si par ailleurs les autres conditions sont modifiées, ou celles qui introduisent une amélioration de l'efficacité de clonage), sont réunies lorsque les quantités de protéine sont déterminées à partir de la loi définie ci-dessus, lorsque la solution de protéine est fraîchement préparée, le temps d'incubation court (moins de 5 minutes) et les concentrations en ADN suffisantes (370ng de fragment fR4 et 190ng de fragment fLZ pour 10µl de milieu de ligation pour l'exemple ci-dessus).

0 La présence de glycérol au moment de la mise en solution de la protéine semble bénéfique à l'efficacité du clonage, dans le cas du mélange naturel d'histones. Elle ne semble pas l'être particulièrement avec les histones isolées (H1 ou H2b), exemple 2). C'est pourquoi le kit pourra comporter (quelle que soit la protéine employée) un tampon de dilution incluant du glycérol (ou tout autre agent ayant les mêmes propriétés) ainsi qu'un tampon de dilution sans glycérol (qui est également le tampon de ligation).

25 30 Remarque :

L'exemple 1a représente tout autant le clonage d'un insert de 3875pb dans un vecteur de 8159pb que le clonage d'un fragment de 8159pb dans un vecteur de 3875pb.

5 Exemple 1b : Clonage d'un fragment de 6785 pb.

I - Matériel et Méthodes.

10 I.1. Fragments.

- Fragment de 2910 paires de bases : fK.

Ce fragment est issu de la digestion du plasmide pBlueScript KS (Stratagene) par SpeI et SalI. Il contient une origine de répllication pour E. coli et la résistance à l'ampicilline d'E. coli.

I.2. Vérification de l'absence de remaniements de séquence.

La coupure par EcoRI du recombinant K-LZ, doit se traduire par 3 fragments de 3426, 3076 et 283pb. De la même manière, ces résultats sont illustrés par la figure 3 (Agarose 1%, marqueurs 1Kb (et/ou ϕ_{x174}) sur les voies de droite).

II - Résultats.

25 Les essais ont été réalisés avec des quantités équimoléculaires de vecteur fK (180ng/10 μ l, 2910pb) et d'insert fLZ (245ng/10 μ l, 3875pb) aux mêmes concentrations en vecteur et insert que dans l'exemple précédent (recombinant R4-LZ).

30 Les quantités de protéine employées correspondent à 33%, 67% et 134% de la quantité indiquée par la loi indiquée ci-dessus (loi aux 2/3).

Le nombre de recombinants K-LZ (6785pb) obtenus par ligation en présence d'un mélange d'histones et clonage dans E. coli est rapporté ci-dessous :

5		Essai 1	Essai 2
	(- protéine)	8	2
	(+protéine)		
	Nbre total	4, 7, 20	n.t., 5, 5
	Avec insert	n.t., n.t., 17	n.t., 5, 4

10

La présence d'histones au moment de la ligation améliore également l'efficacité de clonage.

Exemple 1c : Refermeture d'un fragment de 8159

5 pb.

Il s'agit du fragment fR4 de 8159 pb déjà décrit.

		Essai 1	Essai 2
10	(- protéine)	0	0
	(+ protéine)	5, 1, 9	0, 0, 0

25

L'essai 2 a été effectué avec 150ng de fragment fR4 au lieu de 370ng pour l'essai 1 et 10 µl de milieu de ligation. La protéine a été solubilisée en présence de glycérol dans l'essai 1, sans glycérol dans l'essai 2.

30

EXEMPLE 2 : LIGATION EN PRESENCE D'HISTONES
ISOLEES ET CLONAGE DU RECOMBINANT DE 12034 pb A PARTIR
D'E.COLI.

5 Les deux histones qui ont été employées sont l'histone H1 de thymus de veau (type III-SS, ref. H4524, Sigma) et l'histone H2b de thymus de veau (type VII-S, ref. H4255, Sigma).

10 La loi qui a été calculée pour H1, l'a été sur la base d'une quantité équivalente en moles à la quantité présente dans le mélange naturel, c'est à-dire 6 fois moins (masse moléculaire du mélange M=130 268, masse moléculaire de la protéine H1 M= 21 500). Cette loi a été testée par gel de retardement (Figure 1c)

5 Exemple 2a : ligation en présence d'histone H1.

Le nombre de recombinants obtenus est le suivant :

Essai	1	2	3	4	5
(-protéine)	1(ss insert)	0	0	0	0
(+protéine)					
Nbre total	1,2,4	2,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0
Avec insert	0,1,1	0,0,0	0,0,0	0,0,0	0,0,0

25 - Essais 1, 2, 3 : quantité d'histone H1 équivalente en moles à la quantité d'histone H1 présente dans le mélange (essais 1 et 2, loi aux 2/3, essai 3 : loi exacte)

30 - Essais 4 et 5 : quantité d'histones H1 équivalente en moles à la quantité totale d'histones présente dans le mélange naturel, en remplacement des autres histones

- Essai 5 : quantité d'ADN 5 fois moins importante que dans les autres essais

- Essai 1 et 2 : Glycérol ajouté au tampon de dilution de l'histone H1

- Essais 3 : sans glycérol ajouté.

L'histone H1 n'accroît pas l'efficacité du clonage aussi clairement que le mélange naturel d'histones, dans les mêmes conditions.

Exemple 2b : ligation en présence de l'histone

H2b.

Dans ce cas, la protéine (M = 13 774) représente le dixième du mélange (M = 130 268), et la loi devient :

$$(C) = 1.5 \cdot 10^{-12} \text{ mg H2b /ng ADN /pb de recombinant}$$

Le nombre de recombinants obtenus est le

suivant :

Essai	1'	2'	3'	4	4'
(- protéine)	1	0	0	5 (sans insert)	
(+ protéine)					
Nbre total	1,1,2 5,1,0		25,0,0	26,5,7	12,18,9
Avec insert	0,0,0 2,0,0		15,0,0	13,3,3	4, 6,2

- Essais 4, 4', 3' : sans glycérol, loi exacte

- Essais 1' et 2' : avec glycérol, loi aux 2/3

Les essais 1', 2' et 3' ont été réalisés en parallèle aux essais 1, 2 et 3 effectués en présence de la protéine H1 (même préparation d'ADN, de tampon, et de boîtes de culture) et en parallèle à l'essai 14 avec le mélange d'histones).

Contrairement à l'histone H1, l'histone H2b accroît à elle seule l'efficacité de clonage.

EMC: EL618702487US

27

REVENDICATIONS

1) Procédé de préparation d'acides nucléiques recombinants circularisés, du type constitués d'un vecteur et d'un insert caractérisé en ce que :

a) on réalise la ligation de l'insert et du vecteur en présence d'un agent de compaction de l'ADN, et

b) on sélectionne les acides nucléiques recombinants constitués du vecteur et de l'insert.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les acides nucléiques recombinants circularisés présentent une taille supérieure à 5 kb et de préférence supérieure à 8 ou 10 kb.

3) Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'étape (b) est réalisée grâce au transfert des produits obtenus à l'étape (a) dans un milieu cellulaire approprié au clonage de l'ADN.

4) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape (a) est réalisée en présence d'une protéine ou d'un mélange de protéines compactant l'ADN.

5) Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que lesdites protéines sont choisies parmi les histones, les protéines d'enveloppe virales ou de phages, les protéines du chromoïde bactérien (HU, H-NS, etc...), les protéines chromosomales non histone, les HMG, un mélange de ces composés, ou des dérivés de ceux-ci.

6) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la concentration (C) en agent de compaction n'entraîne pas une rigidification de l'ADN.

5

7) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'étape (a) de ligation de l'insert et du vecteur en présence d'un agent de compaction de l'ADN s'effectue dans un milieu de ligation constitué d'une ligase et d'un tampon correspondant.

10

8) Procédé selon l'une des revendication 1 à 7, caractérisé en ce que la ligase est la *E.Coli* T4 ligase.

5

9) Kit pour la mise en œuvre du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce qu'il comprend :

- une ligase,
- un tampon de ligation correspondant à la ligase,
- un agent de compaction
- éventuellement un agent stabilisant.

)

10) Kit selon la revendication 9, caractérisé en ce que :

- la ligase est la *E.Coli* T4 ligase,
- le tampon de ligation adapté,
- l'agent de compaction est un mélange d'histones, ou un histone isolé,
- l'agent stabilisant, s'il est présent est le glycerol.

25

30